

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 731 173 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
11.09.1996 Patentblatt 1996/37

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/68, G01N 27/447

(21) Anmeldenummer: 95119546.0

(22) Anmeldetag: 12.12.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI

(30) Priorität: 10.03.1995 DE 19508366

(71) Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung
der Wissenschaften e.V. Berlin
D-80539 München (DE)

(72) Erfinder:

- Eigen, Manfred, Prof.Dr.
37075 Göttingen (DE)
- Rigler, Rudolf, Dr.
S-182 36 Danderyd (SE)

(74) Vertreter: Otten, Hajo, Dr.-Ing. et al
Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil,
Patentanwälte,
Rotenbühlstrasse 121
70178 Stuttgart (DE)

(54) Verfahren zum direkten Nachweisen weniger Nucleinsäurestränge

(57) Ein Verfahren zum direkten Nachweisen weniger, vorzugsweise einzelner Nucleinsäurestränge einer bestimmten Zielsequenz (10) in einer Untersuchungslösung umfaßt die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen einer Testlösung mit einem Gemisch (11) unterschiedlicher, kurzer Primer (12, 13, 14), die jeweils eine zu einem Abschnitt (a, b, c) der Zielsequenz (10) komplementäre, sogenannte Antisense-Sequenz (a', b', c') aufweisen und mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen markiert sind,

b) Mischen der Testlösung mit der Untersuchungslösung und Inkubieren dieser gemischten Lösung

(15) unter Hybridisierung der Primer (12, 13, 14) mit den nachzuweisenden Nucleinsäuresträngen zulassenden Randbedingungen, und dann

c) Identifizieren der Zielsequenz (10) in der inkubierten Lösung (15) mit einer Apparatur (20) für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein oder mehrere Primer (12, 13, 14) hybridisiert ist bzw. sind, vor dem Hintergrund der nicht hybridisierten Primer (12, 13, 14) zu diskriminieren.

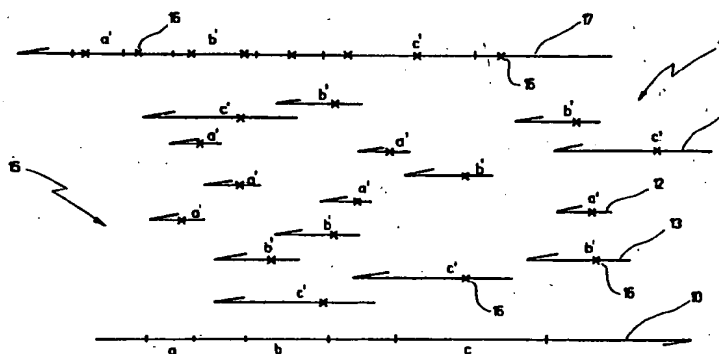


Fig. 1

EP 0 731 173 A2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum direkten Nachweisen weniger, vorzugsweise einzelner Nucleinsäurestränge einer bestimmten Zielsequenz in einer Untersuchungslösung.

Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens sowie eine dabei verwendete Testlösung.

Es ist allgemein wünschenswert, DNA/RNA-Moleküle bekannter, teilweise bekannter und/oder auch unbekannter Sequenz nachweisen zu können. Anwendungsbeispiele hierfür sind genetische Untersuchungen, Analysen von Laborexperimenten z.B. im Rahmen der evolutiven Biotechnologie oder vor allem auch die Virusdiagnostik. In all diesen Anwendungsfällen befinden sich in der ursprünglich vorliegenden Untersuchungslösung häufig nur wenige oder gar einzelne Nucleinsäurestränge der bestimmten Zielsequenz, die in der Untersuchungslösung vorzugsweise quantitativ nachgewiesen werden sollen.

Zur Zeit erfolgt der Nachweis einer Virusinfektion im allgemeinen auf indirektem Wege, nämlich über die Immunantwort des befallenen Wirtes. Der Test ist mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden, die diesem indirekten Verfahren anhaften. Dazu zählen die lange Latenzzeit der verzögerten Immunantwort, die zeitraubende Analyse z.B. eines Elisa-Testes, sowie die Möglichkeit einer falsch-positiven bzw. falsch-negativen Immunantwort.

Es besteht daher das Bestreben, einen direkten Test zu erarbeiten, bei dem das Virus hochspezifisch nachgewiesen werden kann. Die Schwierigkeiten eines direkten Nachweises liegen vor allem in der geforderten hohen Empfindlichkeit. Im Grenzfall muß es nämlich möglich sein, ein einziges Viruspartikel in einem Zellextrakt bzw. in einem Serum nachweisen zu können. Die Konzentration der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge liegt dabei im Bereich zwischen 10^{-12} und 10^{-18} molar.

Ein vor einigen Jahren entwickeltes Verfahren besteht darin, die einzelnen oder wenigen Nucleinsäurestränge auf ein Konzentrationsniveau hochzuverstärken, das konventionellen Methoden wie z.B. der Gelelektrophorese, dem Verfahren der Temperaturgradientengele, der Sequenzierung bspw. nach dem Sanger-Verfahren oder der Maxam-Gilbert-Technik zugänglich ist. Für dieses Hochverstärken stehen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder analoge Verfahren zur Verfügung, die auf einer spezifischen Replikation des nachzuweisenden Nucleinsäureabschnittes beruhen. Dabei nutzt man die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Dabei werden die Nucleinsäurestränge, die eine zu amplifizierende Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei chemisch synthetisierten Oligonucleotiden versetzt, die aus den Randbereichen der zu

amplifizierenden Sequenz stammen und strangspezifisch sind, d.h. komplementär zu einem der beiden DNA-Stränge.

Zum einen sind derartige Verfahren sehr zeitaufwendig, es ist nicht nur erforderlich, die PCR-Reaktion durchzuführen, danach müssen vielmehr weitere Analysen vorgenommen werden, um zumindest qualitativ auf die Anwesenheit der gesuchten Sequenz in der Untersuchungslösung schließen zu können. Ferner ist es hier erforderlich, daß bestimmte kurzkettige Nucleinsäuresequenzen mit einer Länge von etwa 15 - 20 Nucleotiden bereitgestellt werden müssen, die exakt komplementär zu einem entsprechenden Abschnitt der gesuchten Sequenz sind. Man nennt einen solchen exakt komplementären kurzkettigen Nucleinsäureabschnitt allgemein "Antisense-Sequenz" oder auch "Primer".

Neben dem Zeitaufwand ist bei diesem Verfahren weiter von Nachteil, daß nur Nucleinsäuresequenzen nachgewiesen werden können, bei denen zumindest ein kurzer Abschnitt der Sequenzabfolgen an den beiden Enden bekannt ist, so daß die entsprechenden Primer bereitgestellt werden können. Handelt es sich bei den nachzuweisenden Nucleinsäuresträngen um RNA-Moleküle, so müssen diese zunächst sogar noch mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in eine DNA-Kopie umgeschrieben werden, bevor die PCR-Technik eingesetzt werden kann.

Wegen der ggf. vielen verschiedenen Verfahrensschritte weist diese Methode viele Fehlerquellen auf, da die einzelnen Polymerasen nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit die "richtigen" komplementären Nucleotide bei der Polymerisation einbauen, so daß auch hier nicht ausgeschlossen werden kann, daß es zu falsch-positiven und falsch-negativen Testergebnissen kommt.

Ein weiteres Verfahren besteht darin, die gesuchte Sequenz direkt sichtbar zu machen, was bedeutet, daß sie sich zunächst natürlich eindeutig von alternativen Sequenzen unterscheiden muß. Ein neu entwickeltes Verfahren, um einzelne Moleküle zu identifizieren und zu zählen, ist die in der WO 94/16313 beschriebene Korrelationsfluoreszenz-Spektroskopie, die im folgenden kurz FCS genannt wird. Die genannte Druckschrift beschreibt, daß mittels der FCS in einem sehr kleinen Meßvolumen im Bereich von 0,1 - 10 fl einzelne mit Farbstoff markierte DNA/RNA-Moleküle nachgewiesen werden können, sofern sich das nachzuweisende Molekül entweder deutlich von alternativen Molekülen im Meßvolumen unterscheidet oder aber isoliert vorliegt.

Bei der bereits beschriebenen PCR-Methode benötigt man zwei Primersequenzen, von denen die eine komplementär zum Stranganfang des Plusstranges, die andere komplementär zum Anfang des Minusstranges ist. Der Sequenzabschnitt zwischen den Positionen der beiden Primer-Sequenzen wird dann verstärkt. Beim FCS-Nachweis dagegen benötigt man nur eine spezifische Primer-Sequenz, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Sie lagert sich direkt an die zu

detektierende (einzelschrängige) RNA-Sequenz oder an einen Strang der aufgeschmolzenen DNA-Sequenz an. In dieser Form unterscheiden sich die markierten Primer sowohl in ihren Ladungseigenschaften als auch in ihrer Beweglichkeit sehr stark von den ungebundenen Primern und können ohne weitere Verstärkung durch die FCS direkt detektiert werden.

Das Meßprinzip der FCS beruht darauf, daß fluorphore Moleküle in äußerst verdünnten Lösungen gemessen werden, indem ein relativ kleines Volumenelement der Lösung einem starken Anregungslicht eines Lasers ausgesetzt wird. Nur die Moleküle entsprechenden Anregungsspektrums, die sich in diesem Meßvolumen aufhalten, werden durch das Licht angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht aus diesem Volumenelement wird dann auf einen Photomultiplier abgebildet. Handelt es sich um verdünnte Lösungen, so ergeben sich nennenswerte Schwankungen der Konzentration der sich in dem jeweiligen Volumenelement befindlichen Moleküle.

Ein Molekül, das einmal in das Volumenelement hineindiffundiert ist, wird sich gemäß seiner charakteristischen Diffusionsgeschwindigkeit in einer durchschnittlichen, aber für das betreffende Molekül charakteristischen Zeit wieder aus dem Volumenelement entfernen und dann nicht mehr zu beobachten sein.

Wird nun die Lumineszenz ein und desselben Moleküles während seiner durchschnittlichen Aufenthaltsdauer in dem Meßvolumen viele Male angeregt, so lassen sich von diesem Molekül folglich viele Signale erfassen. Bei verdünnten Lösungen ist damit die Wahrscheinlichkeit, daß ein einmal in das Meßvolumen hineindiffundiertes Molekül vor seinem Wiederaustritt nochmals angeregt wird, viel größer, als dies für ein neu eintreffendes Molekül der Fall ist.

In der oben erwähnten WO 94/16313 wird ausgeführt, daß es auf der Basis dieses Meßprinzipes möglich ist, einzelne Moleküle in verdünnten Lösungen zu erfassen. Handelt es sich bei den nachzuweisenden Molekülen um Nucleinsäurestränge, so wird ein zu einer bestimmten Teilsequenz des nachzuweisenden Moleküles komplementärer farbstoffmarkierter Primer zugegeben, dessen Diffusionsverhalten im ungebundenen Zustand sich von dem im an das Zielmolekül gebundenen Zustand unterscheidet.

Um die von der Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten Moleküle abhängige z.T. relativ lange Meßzeit zu reduzieren, beschreibt die erwähnte Druckschrift verschiedene Verfahren, mit denen die nachzuweisenden Moleküle im Meßvolumen aufkonzentriert werden können. Im Prinzip beruhen diese Verfahren darauf, die unterschiedlichen Ladungen von ungebundenen Primern und Primer-Nucleinsäurestrang-Komplexen auszunutzen, um in einem gerichteten elektrischen Feld entweder die ungebundenen Primer von den Komplexen zu trennen, oder aber die unterschiedliche Driftgeschwindigkeit auszunutzen.

Ein anderes Verfahren, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen, besteht darin, zwei verschiedene Primer zu benutzen, die unterschiedlich markiert sind. Durch eine zeitliche Korrelation der von den verschiedenen markierten Primern stammenden Fluoreszenzsignale lassen sich im Wege der elektronischen Signalverarbeitung dann die Signale der nicht-korrelierten, also freien Primer effizient unterdrücken.

Weiter wird beschrieben, daß sich durch ein niederfrequentes elektrisches Wechselfeld von z.B. 4 Hz eine Oszillation der geladenen Moleküle durch das Meßvolumen erzwingen läßt, wodurch die Moleküle quasi fokussiert werden, so daß es möglich ist, nur ein einziges Molekül oder wenige Moleküle im Meßvolumen quantitativ zu erfassen.

Die erwähnte Druckschrift beschreibt viele Anwendungsmöglichkeiten der FCS, beschäftigt sich aber genauer nur mit der Vorrichtung, der Optik und den verschiedenen Molekülfällen. Allerdings wird unter anderem erwähnt, daß mit der FCS-Apparatur auch einzelne DNA/RNA-Stränge unter Verwendung von Primern gezählt werden können. Großes Augenmerk richtet die PCT-Anmeldung auch auf die Messung physikalischer Parameter, wozu u.a. unterschiedlich markierte Liganden eingesetzt werden, was jedoch nicht zur Verbesserung der Intensität der Meßsignale, sondern zur Erhöhung der Spezifität erfolgt. Bei derartig unterschiedlich markierten Sonden wird nämlich eine Kreuzkorrelationstechnik angewendet, um weitere Parameter wie z.B. die Rotationsgeschwindigkeit des nachzuweisenden Moleküles bestimmen zu können.

Allgemein wird beschrieben, daß elektrophoretische Trennverfahren, Kapillaren, Gleichfelder etc. verwendet werden können, um der Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten Moleküle eine Driftgeschwindigkeit zu überlagern. Die Primer und die Zielmoleküle können dabei so ausgewählt werden, daß sie unterschiedliche Ladungen aufweisen und damit im elektrischen Feld unterschiedlich wandern.

Die FCS-Methode weist somit gegenüber dem PCR-Verfahren oder analogen Methoden eine Reihe von Vorteilen auf. Zunächst läßt sich die FCS-Methode sowohl auf einzelschrängige als auch auf doppelsträngige Nucleinsäuremoleküle direkt anwenden. Da viele Pathogene einsträngige RNA-Viren sind, müssen diese bei dem FCS-Verfahren nicht zunächst in DNA umkopiert werden, was sich im Zeitaufwand für die Analyse positiv bemerkbar macht. Darüber hinaus ist die FCS-Methode direkter, sie weist nämlich die einzelnen Nucleinsäuren nach, die im Falle von PCR erst vervielfältigt werden müssen, was ebenfalls einen Unterschied im Zeitaufwand bedingt.

Darüber hinaus kann der Verstärkungsprozeß durch bestimmte Substanzen gestört oder gehemmt werden, so daß das PCR-Verfahren für natürliche Proben nicht immer zuverlässig ist.

Genauso wie das PCR-Verfahren ist die FCS-Methode jedoch in bezug auf die Spezifität stör anfällig. Eine Primersequenz kann nämlich z.B. in Teilabschnitt

ten auch zu Sequenzen komplementär sein, die der Zielsequenz zufällig ähnlich sind. Man wählt deshalb Primersequenzen der Länge 15 bis 20 Nucleotide aus, um eine hinreichende Spezifität bei der Bindung zu erzielen. Dann muß aber auch sichergestellt werden, daß die Schmelzpunkte von nur teilweise komplementären Sequenzen unterhalb der Arbeitstemperatur liegen, also meßtechnisch nicht erfaßt werden.

Beim PCR-Verfahren verwendet man zwei Primersequenzen, wobei die Wahrscheinlichkeit, daß beide Sequenzen Fehlbindungen aufweisen, gering ist. Dafür müssen die Primer hier aber in sehr viel höherer Konzentration eingesetzt werden, da sie durch die Reaktion verbraucht werden.

Bei der FCS-Methode muß die Primerkonzentration dagegen lediglich so hoch sein, daß eine Anlagerung an die nachzuweisenden Nucleinsäurestränge innerhalb der Meßzeit auch erfolgen kann.

Diese Bedingungen schränken die Anwendbarkeit der Methode auf kleine Absolutmengen erheblich ein.

Hiervon ausgehend ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren von der eingangs genannten Art zu schaffen, das die oben erwähnten Nachteile und Schwierigkeiten überwindet sowie einen schnellen und sicheren direkten Nachweis von Nucleinsäuresträngen ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe einerseits gelöst durch ein Verfahren der eingangs genannten Art mit den Schritten:

a) Bereitstellen einer Testlösung mit einem Gemisch unterschiedlicher, kurzer Primer, die jeweils eine zu einem Abschnitt der Zielsequenz komplementäre, sogenannte Antisense-Sequenz aufweisen und mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen markiert sind,

b) Mischen der Testlösung mit der Untersuchungslösung und Inkubieren dieser gemischten Lösung unter Hybridisierung der Primer mit den nachzuweisenden Nucleinsäuresträngen zulassenden Randbedingungen, und dann

c) Identifizieren der Zielsequenz in der inkubierten Lösung mit einer Apparatur für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein oder mehrere Primer hybridisiert ist bzw. sind, vor dem Hintergrund der nicht hybridisierten Primer zu diskriminieren.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst. Durch die Hybridisierung vieler Primer mit der Zielsequenz wird nämlich die lokale Konzentration der Primer bspw. im Meßvolumen bei der FCS-Technik stark erhöht, wenn eine Zielsequenz mit angelagerten Primern in das Meßvolumen diffundiert, was als "Lichtblitz" im registrierten Fluoreszenzsignal zu sehen ist. Die Erfinder der vorliegenden

Anmeldung haben nämlich erkannt, daß es möglich ist, einen derartigen "Cocktail" von Primern zu verwenden, da es bei dem Nachweis einzelner Nucleinsäurestränge lediglich darauf ankommt, das Fluoreszenzsignal zu verstärken. Sequenzen, an die sich quasi "zufällig" ein Primer anlagert, werden wegen des sehr viel geringeren Signales im Gegensatz zu der bekannten FCS-Methode jetzt nicht mehr falsch-positiv angezeigt.

Die Geschwindigkeitskonstante der Hybridisierung zwischen Primern und Zielsequenzen liegt allgemein unterhalb von $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, so daß schon bei Primerkonzentrationen von 10^{-9} M die Reaktionszeit tausend Sekunden übersteigt. Liegt nun die Zielsequenz selbst nur in wenigen Kopien, z.B. einem Strang pro Mikroliter vor, so wird ein direkter Nachweis unmöglich, denn im genannten Beispiel wäre der ungebundene Primer z.B. in milliardenfachen Überschuß vorhanden. Beiträge der gebundenen Fluoreszenzmarker wären viel zu klein, um nach der FCS-Methode registriert werden zu können.

Dieses Problem wird jedoch erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß der Cocktail von Primersequenzen bereitgestellt wird, die zu verschiedenen Regionen des Zielmoleküls komplementär sind. Jede Primersequenz kann im Mittel mit einem Fluoreszenzmarker, die alle aus dem gleichen, möglicherweise aber auch aus verschiedenen Fluorophoren bestehen, versehen sein. Dieser Cocktail wird z.B. in einer Konzentration von etwa 10^{-9} M angeboten, was ein Molekül pro Femtoliter bedeutet. Bei dem FCS-Verfahren, bei dem die "Lichtfalle" des Laserstrahles ein Volumen von ca. 0,2 fl besitzt, würde also ein "Hintergrundrauschen" registriert, das der Gegenwart von einem Fluoreszenzmarker in etwa 20 % der Zeit entspricht. Gerät nun ein Zielmolekül in die Licht- oder Molekülfalle, so würde das ein plötzliches "Aufleuchten" der Fluoreszenz bewirken, denn nunmehr wären z.B. 20 bis 100 Fluoreszenzmarker in der Lichtfalle gleichzeitig anwesend. Während das markierte Zielmolekül in der mittleren Intensität vollständig untergehen würde, erschiene es in der Fluktuationregistrierung von FCS quasi als "Leuchtbombe".

Prinzipiell ist diese Idee auch auf Tumorzellen anwendbar, um einen schnellen direkten Tumornachweis zu ermöglichen. Hier kann die Tatsache ausgenutzt werden, daß jede Tumorzelle mehrere tausend antigene Determinanten für Antikörper aufweist. Wenn jetzt die Antikörper mit Farbstoffen markiert werden, so kann eine Tumorzelle, an die Antikörper gebunden haben, als "Lichtblitz" bei dem erwähnten FCS-Verfahren nachgewiesen werden. Auch hier wird der Effekt der Aufkonzentration der mit Farbstoff markierten Antikörper durch die Anlagerung an die Tumorzelle ausgenutzt. Ein auf dieser Idee basierender Tumornachweis wäre eine alternative Anwendung der erfindungsgemäßen Idee, viele verschiedene farbstoffmarkierte Sonden gegen ein Zielobjekt einzusetzen, an dem diese Sonden in größerer Zahl binden können. Hält man die Konzentration der Sonden so gering, daß sie in dem beobachteten Meßvolumen mit einer statistischen

Wahrscheinlichkeit auftauchen, die deutlich geringer ist als die Zahl der im Mittel an dem Zielobjekt gebundenen Sonden, so läßt sich die Aufkonzentrierung der Sonden im Meßvolumen messen, wenn ein Zielobjekt mit gebundenen Sonden in das Meßvolumen eintritt.

Andererseits wird diese Aufgabe bei einem Verfahren der eingangs genannten Art gelöst durch die Schritte:

1) Hybridisieren zumindest einiger der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge mit jeweils einem langen Antisense-Strang, der mit mehreren Farbstoffmolekülen markiert und zu der gesamten oder nahezu der gesamten Zielsequenz komplementär ist, und

2) Identifizieren der Zielsequenz mit einer Apparatur für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein Antisense-Strang hybridisiert ist, zu diskriminieren.

Auch hierdurch wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe vollkommen gelöst. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignales erfolgt jetzt dadurch, daß der Antisense-Strang mit sehr vielen Farbstoffmolekülen markiert ist, so daß ein derartiger Doppelstrang ebenfalls als "Lichtblitz" im registrierten Fluoreszenzsignal zu sehen ist.

Die Hybridisierung zwischen nachzuweisendem Nucleinsäurestrang und Antisense-Strang kann entweder dadurch erfolgen, daß der Antisense-Strang gesondert hergestellt und wie bei dem Verfahren mit den kurzen Primern zu der Untersuchungslösung hinzugegeben sowie einem geeigneten Tempervorgang unterzogen wird.

Andererseits ist es auch möglich, den farbstoffmarkierten Doppelstrang aus nachzuweisendem Nucleinsäurestrang und Antisense-Strang durch direktes Aufpolymerisieren des nachzuweisenden Nucleinsäurestranges zu erzeugen, wobei farbstoffmarkierte Nucleinsäure-(oder analoge) Bausteine eingesetzt werden. Vorzugsweise verwendet man hier markierten UTPs. Sollte sich der so erzeugte Doppelstrang, der mit sehr vielen Farbstoffmolekülen markiert ist, vor dem Hintergrund der freien, ebenfalls markierten Bausteine nicht nachweisen lassen, so müssen geeignete Trennverfahren vorgeschaltet werden, bevor die den markierten Doppelstrang enthaltende Lösung bspw. in eine FCS-Apparatur gegeben wird, wie sie weiter unten noch ausführlicher beschrieben ist.

In einem Ausführungsbeispiel des ersten erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt a) zu unterschiedlichen, vorzugsweise nicht überlappenden Abschnitten der Zielsequenz komplementäre Primersequenzen bereitgestellt, wobei unterschiedliche Primersequenzen sich in der Sequenzabfolge der Nucleinsäure- (oder analoger) Bausteine voneinander unterscheiden.

Hier ist von Vorteil, daß die Zahl der an eine Zielsequenz bindenden Primersequenzen besonders groß ist, so daß eine hohe Aufkonzentrierung der Primersequenzen im Meßvolumen erfolgt, was eine größere Sicherheit gegen falsch-positive Meßergebnisse wegen zufällig passender einzelner Primer gewährleistet.

Dabei ist es dann bevorzugt, wenn in Schritt a) Primer unterschiedlicher Frequenzlänge, also mit unterschiedlicher Zahl von Nucleinsäure- (oder analoger) Bausteinen pro Primer bereitgestellt werden, wobei die Primer eine Sequenzlänge zwischen 10 und 50, vorzugsweise 15 und 20 Bausteinen aufweisen.

Durch die unterschiedlichen Primerlängen kann in vorteilhafter Weise den Sekundärstrukturen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge Rechnung getragen werden. Kurzsträngige Primer würden dabei gegen einzelsträngig vorliegende Bereiche der Nucleinsäurestränge eingesetzt werden, während längere Primersequenzen z.B. gegen doppelsträngig vorliegende Bereiche eingesetzt würden, die zunächst durch entsprechende Temperaturwahl aufgeschmolzen werden müßten, wobei die Primer dann in Konkurrenz zu der Ausbildung der Sekundärstruktur treten würden. Wegen der größeren Anzahl von Bausteinen ist die Bindung zwischen länger-kettigen Primern und den zugeordneten Bereichen der Zielsequenz hier so groß, daß die Primerbindung vorrangig vor der erneuten Ausbildung der Sekundärstruktur erfolgt. Es hat sich herausgestellt, daß Primer mit einer Sequenzlänge zwischen 15 und 20 Bausteinen einerseits eine hinreichend spezifische Bindung mit komplementären Bereichen der Zielsequenz eingehen und andererseits keine zufälligen unspezifischen Bindungen zulassen.

In einer Weiterbildung ist es dann bevorzugt, wenn Primer mit 10 bis 200, vorzugsweise 20 bis 100 verschiedenen Sequenzen bereitgestellt werden.

Auf diese Weise würden zwischen 300 und 2.000 komplementäre Bausteine an die Zielsequenzen angelagert werden, die als Virus-RNA bspw. eine Sequenzlänge zwischen 4.000 und 10.000 Bausteinen aufweist, so daß sie bei einer derartigen Hybridisierung im Mittel die maximale Anzahl von anzulagernden Primern aufnimmt. Von Vorteil ist dabei, daß es zu einer sehr starken Aufkonzentrierung an Primern und damit einer starken Erhöhung des fluktuierenden Fluoreszenzsignales kommt, wenn ein derartiger Komplex aus Zielmolekül und Primern in das Meßvolumen wandert, was die Meßsicherheit weiter erhöht.

Allgemein ist es bevorzugt, wenn die Primer durch direkte Synthese, bspw. mittels eines Nucleinsäure-Synthetisierers hergestellt werden.

Hier ist von Vorteil, daß ein absolut sicherer Weg zur Bereitstellung der verschiedenen Oligonucleotide (Primer) beschritten wird. Dieser Weg ist zwar zeitraubend, schließt aber eine mögliche Präsenz der gesamten Zielsequenz innerhalb des angebotenen "Cocktails" und damit eine Fehlanzeige der Zielsequenz aus. Ferner lassen sich überlappende Primersequenzen ver-

meiden, wodurch eine gezielte Markierung möglich ist. Allerdings muß die Zielsequenz genau bekannt sein.

Andererseits ist es bevorzugt, wenn die Primer durch Replikation oder Transkription der Zielsequenz in Gegenwart von mit Farbstoffmolekülen markierten Nucleinsäure- (oder analogen) Bausteinen hergestellt werden, wobei die Replikations- oder Transkriptionsprodukte anschließend in Teilsequenzen zerschnitten werden, die dann als Primer verwendet werden.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß es deutlich schneller abläuft, allerdings enthält der Cocktail zu Beginn des Verfahrens noch die Zielsequenz, die jedoch nicht genau bekannt sein muß. Es muß also sichergestellt werden, daß bei dem Zerschneiden in jedem Falle die Zielsequenz abgebaut wird, um eine Fehlangebe zu verhindern. Dieses Zerschneiden der Replikations- oder Transkriptionsprodukte kann bspw. auf mechanischem Wege erfolgen, indem Scherkräfte aufgewandt werden, die die Produkte zerschlagen.

Andererseits ist es möglich, die Replikations- oder Transkriptionsprodukte für bestimmte Zeitspannen der Wirkung spezifisch und/oder unspezifisch schneidender Nucleasen auszusetzen, um sie zu Primern abzubauen.

Hier ist von Vorteil, daß dieser Abbau zeitlich so gesteuert werden kann, daß Primer mit einer gewünschten mittleren Länge entstehen.

Insgesamt ist es bevorzugt, wenn die Replikations- oder Transkriptionsprodukte durch Verwendung der Polymerase-Kettenreaktionstechnik, eines analogen Verfahrens oder mit Hilfe anderer spezifischer RNA- bzw. DNA-Polymerasen hergestellt werden.

Hier handelt es sich um gut eingeführte Verfahren, die in vorteilhafter Weise angewendet werden können, um aus der Zielsequenz die Primer zu erzeugen. In vorteilhafter Weise können hier Primer gegen Zielsequenzen hergestellt werden, deren Sequenzabfolge nur teilweise oder gar nicht bekannt ist. Es ist lediglich erforderlich, daß die Enden der Zielsequenzen bekannt sind oder daß bekannte Sequenzabschnitte an völlig unbekannte Zielsequenzen ansynthetisiert werden, so daß die für das PCR-Verfahren erforderlichen Primer bereitgestellt werden können. Der zwischen den beiden Primern liegende Bereich der Zielsequenz muß nicht zwingend in der Abfolge bekannt sein, die Primer für die Analyse werden sozusagen "automatisch" richtig erzeugt, so daß z.B. auch neue Viren gesucht werden können.

Weiter ist es bevorzugt, wenn mittels eines DNA-Synthesizers kurze DNA-Stränge hergestellt werden, die Abschnitte der Zielsequenz aufweisen, wenn diese DNA-Stränge dann bspw. mit der T7-Polymerase transkribiert und die Transkriptionsprodukte als Primer verwendet werden.

Hier ist von Vorteil, daß auf bekanntem Wege RNA-Primer hergestellt werden können, die dann erfindungsgemäß als Cocktail gegen eine nachzuweisende RNA-Zielsequenz eingesetzt werden können, ohne daß dazu

die gesamte Sequenzabfolge der Zielsequenz bekannt sein muß.

Allgemein ist es bevorzugt, wenn als Primer DNA-, RNA- oder PNA-Sequenzen verwendet werden.

Hier ist von Vorteil, daß DNA- und RNA-Zielsequenzen nachgewiesen werden können, wobei die Verwendung von ggf. positiv geladenen PNA-Sequenzen, die ein Peptid-ähnliches Rückgrat aufweisen und daher nicht - wie RNA und DNA - negativ geladen sind, eine elektrophoretische Trennung zwischen freien und komplexierten Primern ermöglicht. Durch Anhängen einer positiven Restgruppe können PNAs auch mit positiver Ladung versehen werden, was die Trennung weiter erleichtert.

Weiter ist es bevorzugt, wenn in Schritt b) die gemischte Lösung bei einer Temperatur inkubiert wird, die so hoch ist, daß Tertiär- und Sekundärstrukturen der Zielsequenz aufschmelzen, die hinreichend tief ist, so daß die spezifischen Bindungen zwischen Primer und Zielsequenz nicht aufschmelzen, und die hinreichend hoch ist, so daß unspezifische Bindungen zwischen Primer und Zielsequenz aufschmelzen.

Hierdurch wird in vorteilhafter Weise ein wichtiges Problem bei der Markierung gelöst. Die Geschwindigkeitskonstante für die Anlagerung von Primersequenzen liegt nämlich im allgemeinen unterhalb von $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, so daß bei den vorteilhafterweise eingesetzten Primerkonzentrationen von 10^{-9} M^{-9} bereits Reaktionszeiten von mehr als 1.000 Sekunden auftreten. Diese Werte sind nun aber stark temperaturabhängig, denn die Sekundärstruktur der Zielsequenz muß aufschmelzen, bevor die Primersequenzen sich anlagern können. Andererseits muß man aber bei Temperaturen arbeiten, die unterhalb des Schmelzpunktes der Primerbindung liegen, wobei zur Ausschaltung von unspezifischen Fehlanlagerungen die Temperatur direkt unterhalb dieses Schmelzpunktes liegen sollte.

Aus all dem folgt, daß die Markierung der Zielsequenzen mit dem Primer-Cocktail vorteilhafterweise durch einen genau festgelegten Temperprozeß zu erzielen ist, der die genannten Schmelzpunkte quantitativ berücksichtigt.

In einer Weiterbildung ist es hier bevorzugt, wenn die Primer hierzu in großem Überschuß gegenüber der Zielsequenz eingesetzt werden, wobei nach erfolgter Inkubation die ungebundenen Primer von der hybridisierten Zielsequenz abgetrennt werden können.

Hier ist von Vorteil, daß man zunächst bei höheren Primerkonzentrationen eine Sättigung der Hybridisierung vornehmen und anschließend die unreaktierten Primer abtrennen kann.

Dies ist insbesondere dann auf einfachem elektrophoretischem Wege möglich, wenn als Primer positiv geladene PNA-Sequenzen verwendet werden.

Das Identifizieren der mit den Primern hybridisierten Zielsequenz im Schritt c) kann mittels einer beliebigen zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgen, die in der Lage ist, in einem sehr kleinen Volumenelement sehr geringe Fluoreszenzsignale bis hin-

unter zur Einzelphotonenzählung zu erfassen. Wichtig ist dabei, daß durch die Zeitauflösung die von freien Primern stammenden Signale sich deutlich von denen unterscheiden, die von durch die Zielsequenz sozusagen aufkonzentrierten Primern stammen.

Vorzugsweise erfolgt dies mittels einer Korrelationsfluoreszenz-Spektroskopie, bei der ein sehr kleines Volumenelement, vorzugsweise 0,1 - 20 fl der inkubierten Lösung einem Anregungslicht eines Laser ausgesetzt wird, das die in diesem Meßvolumen befindlichen Primer zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Meßvolumen mittels eines Photodetektors gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der relativen Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten Moleküle erstellt wird, so daß bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Meßvolumen identifiziert werden. Dabei ist es dann bevorzugt, wenn ein elektrisches Feld verwendet wird, um die Driftgeschwindigkeit der mit Primern hybridisierten Zielsequenzen über die Diffusionsgeschwindigkeit hinaus zu erhöhen.

Da ein großes RNA- oder DNA-Molekül relativ langsam diffundiert, muß man es nämlich mit Hilfe spezieller Verfahren in der Lichtfalle aufkonzentrieren. Im Falle gewöhnlicher Diffusion, unter Annahme eines Diffusionskoeffizienten von $5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ wie er für M13-Phagen gemessen wurde, beträgt die mittlere Zeit für die Diffusion einer Zielsequenz in eine Lichtfalle vom Durchmesser $0,5 \mu\text{m}$ etwa 10^{-10} s , wobei c die molare Konzentration der Zielsequenz ist. Mit $c = 10^{-15} \text{ M}$ ergäbe sich bereits eine Diffusionszeit von einem Tag.

Eine Verkürzung der Diffusionszeit läßt sich zwar auch durch die Vergrößerung des Raumelementes der Lichtfalle erreichen, hier sind jedoch enge Grenzen gesetzt, weil der Rauschhintergrund mit der dritten Potenz des Radius des Raumelementes ansteigt.

Eine wirksamere Methode ist die erwähnte Erhöhung der Driftgeschwindigkeit mit Hilfe elektrischer Felder, wodurch in vorteilhafter Weise die Meßzeit deutlich verkürzt werden kann.

Dabei ist es bevorzugt, wenn eine kapillarelektrophoretische Trennung von ungebundenen Primern und mit Primern hybridisierten Zielsequenzen erfolgt, wobei eine Kapillare mit einer Spitzenöffnung von kleiner 0,01 mm vor das Meßvolumen plaziert und in der Kapillare ein elektrisches Gleichfeld erzeugt wird, das die mit Primern hybridisierten, negativ geladenen Zielsequenzen in Richtung auf das Meßvolumen bewegt.

In vorteilhafter Weise kann hier eine ausgezogene Kapillare, eine sogenannte Neher-Kapillare verwendet werden, wie sie z.B. beschrieben ist in dem Artikel "The Patch Clamp Technique", E. Neher und B. Sakmann, in Scientific American, März 1992, Seiten 44 - 51. Aus der eingangs erwähnten WO 94/16313 ist es bereits bekannt, in einer derartigen Kapillare ein Feld von etwa 1 kV/cm zu erzeugen, was eine Wandungsgeschwindigkeit von ca. 1 mm/s bewirkt.

Anstelle der Kapillare kann auch eine Quadrupol- oder Radial-Ionenfalle eingesetzt werden, wobei letztere besonders wirksam ist. Sie besteht aus einer "punktförmigen" Spitze (z.B. Neher-Kapillare), die von einer Ringelektrode mit einem Durchmesser von bspw. 1 cm umgeben ist. Das Feld ist in diesem Falle ein Gleichfeld, mit positiv geladener Spitze der Kapillare. Die negativ geladene Zielstruktur reichert sich im inhomogenen Feld an der Spitze an. Dort gibt es ein Gleichgewicht zwischen Antransport durch Wanderung im Feld und Abtransport durch Diffusion. Die langsam diffundierenden Zielstrukturen reichern sich bis zu 10^3 -fach stärker an als ihre niedermolekularen Primer.

Andererseits ist es bevorzugt, wenn in Schritt c) ein hochfrequentes, inhomogenes elektrisches Wechselfeld verwendet wird, das in den Zielsequenzen ein Dipolmoment induziert, das als solches in dem inhomogenen Feld wandert.

Hier wird auf vorteilhafte Weise ein wesentlicher Nachteil der kapillarelektrophoretischen Trennung oder der Radial-Ionenfalle beseitigt, da eine Mitanreicherung nicht-markierter Primer vermieden wird.

In dem Artikel "Structure and kinetic properties of polyelectrolytes in solution, determined from relaxation phenomena in electric fields", M. Eigen und G. Schwarz, in "Electrolytes", Pergamon Press 1962, wurde gezeigt, daß stäbchenförmige Polyelektrolyte und insbesondere Nucleinsäuren eine elektrische Polarisierbarkeit besitzen, die aus einer Verschiebung der Ionenwolke relativ zum Poly-Ion im elektrischen Feld resultiert. Speziell bei DNA ergeben sich sehr große induzierte Dipolmomente, die bereits bei Feldstärken von 10^3 Volt/cm zur vollständigen Ausrichtung im Feld führen. Die Relaxationszeit der Polarisierung liegt bei einer Mikrosekunde, so daß mit hochfrequenten Wechselfeldern bei etwa 10^5 bis 10^6 Hz gearbeitet werden kann. Die Ausrichtung erfolgt innerhalb von Millisekunden bis Sekunden.

Mit anderen Worten, hochfrequente Wechselfelder induzieren in Nucleinsäuren starke Dipolmomente, was durch eine Änderung der Leitfähigkeit einer Lösung mit derart beaufschlagten Nucleinsäuren gezeigt werden kann. Das bedeutet nun aber, daß Nucleinsäuren in einem inhomogenen hochfrequente Wechselfeld in Richtung der höheren Feldstärke wandern, was erfindungsgemäß ausgenutzt wird, um die markierten Zielsequenzen im Meßvolumen aufzukonzentrieren, da ein Dipol im inhomogenen Feld in Richtung der größten Feldstärke wandert, die so gelegt werden kann, daß sie sich im Meßvolumen befindet.

Dazu wird eine radiale Elektrodenanordnung verwendet, die aus einer in der Lichtfalle angebrachten Elektroden spitze und einer ringförmigen Gegenelektrode besteht.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der Beschreibung und der beigefügten Zeichnung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen,

sondern auch in anderen Kombinationen oder in Allein-
stellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorlie-
genden Erfindung zu verlassen.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der
Zeichnung dargestellt und wird in der nachfolgenden
Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine vereinfachte, schematische Darstellung
einer Inkubationslösung aus Zielsequenz
und Primern; und

Fig. 2 eine vereinfachte, schematische Darstellung
einer Apparatur für optische Analysen mit
einer nicht maßstabsgetreu eingezeichneten
elektrische Molekülfalle, die ein hochfre-
quentes, inhomogenes elektrisches Wech-
selfeld verwendet.

In Fig. 1 ist schematisch ein Nucleinsäurestrang in
Form einer Zielsequenz 10 dargestellt, bei der einzelne,
ausgewählte Sequenzabschnitte mit a, b und c bezeich-
net sind.

Neben der Zielsequenz 10 ist ein Gemisch 11 von
Primern 12, 13 und 14 dargestellt, die sich zusammen
mit der Zielsequenz 10 in einer Inkubationslösung 15
befinden.

Die Primer oder Oligonucleotide 12 weisen eine zu
dem Abschnitt a komplementäre Sequenz a' auf, wäh-
rend die Primer 13 und 14 komplementäre Sequenzen
zu den Abschnitten b bzw. c aufweisen.

Die Primer 12, 13 und 14 sind jeweils mit einem
oder mit mehreren Farbstoffmolekülen 16 markiert, die
bei entsprechender Anregung ein Fluoreszenzlicht aus-
senden. Die Farbstoffmoleküle 16 sind in Fig. 1 durch
ein Kreuz symbolisiert.

Statt vieler Primer 12, 13, 14 kann auch ein mehr
oder weniger kompletter Antisense-Strang 17 einge-
setzt oder durch Polymerisation der Zielsequenz 10 zu
einem Doppelstrang erzeugt werden, der mit vielen
Farbstoffmolekülen 16 markiert und zu der ganzen Ziel-
sequenz 10 komplementär ist.

Wenn die Lösung 15 bei einer Temperatur inkubiert
wird, die so hoch ist, daß mögliche Sekundärstrukturen
der Zielsequenz 10 aufschmelzen, aber hinreichend tief
ist, daß eine spezifische Bindung zwischen den Primern
12, 13 und 14 und den entsprechenden Abschnitten a,
b und c der Zielsequenz 10 nicht aufschmelzen, dann
lagern sich die Primer 12, 13, 14 an der Zielsequenz 10
an. Die Inkubationstemperatur muß dabei hinreichend
hoch sein, so daß unspezifische Bindungen zwischen
Primern 12, 13 und 14 und der Zielsequenz 10 wieder
aufschmelzen.

Auf diese Weise erhält man eine Lösung 15, in der
die Zielsequenz 10 oder die wenigen Zielsequenzen 10
jeweils mehrere Primer 12, 13, 14 tragen, wobei die
Primer eine Sequenzlänge zwischen 15 und 20 Bau-
steinen aufweisen und insgesamt 20 bis 100 verschie-
dene Primer 12, 13, 14 bereitgestellt sind.

Die Primer 12, 13 und 14 können entweder durch
direkte Synthese bspw. mittels eines Nucleinsäure-Syn-
thetisierers hergestellt werden, wobei z.B. mittels eines
DNA-Synthetisierers kurze farbstoffmarkierte DNA-
Stränge hergestellt werden, die Abschnitte a, b oder c
der Zielsequenz 10 aufweisen. Diese DNA-Stränge
werden dann bspw. mit der T7-Polymerase transkribiert
und die Transkriptionsprodukte als Primer 12, 13, 14
verwendet. Dieses Herstellungsverfahren für das
"Cocktail" genannte Gemisch 11 setzt voraus, daß die
Abschnitte a, b und c in der Sequenz bekannt sind.

Soll dagegen ein in der Sequenz teilweise oder
ganz unbekannter Nucleinsäurestrang 10 als Zielse-
quenz verwendet werden, so werden die Primer 12, 13
und 14 durch Replikation oder Transkription der Zielse-
quenz in Gegenwart von mit Farbstoffmolekülen mar-
kierten Nucleinsäure-Bausteinen herstellt. Dies kann
bspw. durch Verwendung der Polymerase-Kettenreakti-
onstechnik, eines analogen Verfahrens oder mit Hilfe
einer DNA- bzw. RNA-Polymerase, wie z.B. der T7-
Polymerase, einer reversen Transkriptase etc. erfolgen.

Die Replikations- oder Transkriptionsprodukte wer-
den anschließend in Teilsequenzen zerschnitten, wobei
entweder mechanische Verfahren oder spezifisch
und/oder unspezifisch schneidende Nucleasen einge-
setzt werden, um die Produkte zu Primern abzdauen.
Hier muß selbstverständlich sichergestellt werden, daß
in dem Gemisch 11 keine der ursprünglich als Vorlage
für die Transkription/Replikation verwendeten Zielse-
quenzen mehr enthalten ist, um falsch-positive Anzei-
gen zu vermeiden.

Als Zielsequenz 10 und Primer 12, 13 und 14 kön-
nen sowohl RNA-als auch DNA-Moleküle verwendet
werden. Ferner ist es möglich, als Primer 12, 13, 14
sogenannte PNA-Moleküle zu verwenden, die mit posi-
tiver Ladung versehen werden können, so daß sich eine
Abtrennung der freien Primer 12, 13, 14 von den Zielse-
quenzen 10 mit daran gebundenen Primern 12, 13, 14
auf elektrophoretischem Wege bewerkstelligen läßt.

Bei Verwendung des Antisense-Stranges 17 kann
dieser entweder der Untersuchungslösung zugegeben
werden, woraufhin dann ein entsprechendes Temper-
verfahren für die Doppelstrangbildung sorgt. Anderer-
seits ist es auch möglich, der Zielsequenz 10
farbstoffmarkierte Nucleinsäure-Bausteine zuzugeben
und mit Hilfe einer Polymerase die Zielsequenz 10 zu
einem Doppelstrang aus Zielsequenz 10 und Anti-
sense-Strang 17 aufzupolymerisieren. Die Spezifität
bezüglich der nachzuweisenden Zielsequenz 10 wird
dadurch erreicht, daß der Zielsequenz 10 zunächst ein
spezifisches Oligonucleotid zugegeben werden muß,
das mit dem Stranganfang der Zielsequenz 10 eine
doppelsträngige Region bildet, die dann als Primer für
die Polymerase dient. Unterschiedliche Zielsequenzen
10 können so durch unterschiedliche Primer für die
Polymerase ausgewählt werden. Auf diese Weise wird
die Zielsequenz zu einem mit vielen Farbstoffmolekülen
markierten Doppelstrang aufpolymerisiert.

Ein Teil der Inkubationslösung 15 wird dann in eine in Fig. 2 schematisch dargestellte und mit 20 bezeichnete Apparatur für optische Analysen gegeben, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. 5 den ein oder mehrere Primer hybridisiert sind bzw. ist, vor dem Hintergrund der nicht hybridisierten Primer zu diskriminieren.

Die in Fig. 2 gezeigte Apparatur 20 ist eine FCS-Apparatur, wie sie bspw. aus der eingangs erwähnten WO 94/16313 bekannt ist. Für eine ausführliche Beschreibung des Aufbaus und der Funktion dieser FCS-Apparatur 21 wird auf diese Druckschrift sowie die darin aufgeführten Zitatstellen verwiesen.

In einem kurzen Überblick umfaßt die FCS-Apparatur 21 einen Laser 22, der über einen Strahlteiler 23 und eine konfokale

Abbildungsoptik 24 ein kleines Meßvolumen 25 ausleuchtet, das im Bereich zwischen 0,1 und 10 fl liegt. Dieses Meßvolumen 25 wird über die konfokale Optik 24 auf einen Photodetektor 26 abgebildet, der mit einer nicht weiter dargestellten Auswertelektronik für die FCS-Analyse verbunden ist.

Das Meßvolumen 25 bedeckt einen kleinen Teil der Inkubationslösung 15, die in Fig. 2 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ist.

Beinhaltet die Inkubationslösung 15 den oben erwähnten, farbstoffmarkierten Doppelstrang, so müssen ggf. noch die freien farbstoffmarkierten Nucleinsäure-Bausteine ggf. elektrophoretisch abgetrennt werden, bevor die Inkubationslösung 15 in die Apparatur 20 gegeben werden kann. Wegen der vielen in dem Doppelstrang befindlichen Farbstoffmoleküle erscheint ein in das Meßvolumen 25 wandernder derartiger Doppelstrang als Lichtblitz und ist somit ohne weiteres identifizierbar. Da der zugegebene oder erzeugte Antisense-Strang 17 nur spezifisch zu der Zielsequenz 10 "paßt", bedeutet ein derartiger Lichtblitz, daß die nachzuweisenden Nucleinsäurestränge tatsächlich die Zielsequenz 10 aufweisen.

Um die mit Primern 12, 13, 14 hybridisierten Zielsequenzen 10 schneller als diffusionskontrolliert in das Meßvolumen 25 zu befördern, ist in Fig. 2 eine elektrische Molekülfalle 27 vorgesehen, die in dem gezeigten Ausführungsbeispiel eine Ringelektrode 28 sowie eine Neher-Kapillare 29 umfaßt, deren ausgezogene Spitze zentrisch zu der Ringelektrode 28 liegt.

Wird jetzt zwischen Ringelektrode 28 und Neher-Kapillare 29 eine elektrische Spannung angelegt, so erfolgt eine Drift der Zielsequenzen 10 in das Meßvolumen 25. Wenn die Primer 12, 13, 14 und die Zielsequenzen 10 unterschiedliche Ladungen aufweisen, erhält man gleichzeitig eine elektrophoretische Trennung.

In dem gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Spannung 30 jedoch eine Wechselspannung 31, die zwischen der Ringelektrode 28 und der Neher-Kapillare 29 ein inhomogenes, hochfrequentes elektrisches Wechselfeld erzeugt. Die Frequenz dieses Wechselfeldes

liegt dabei vorzugsweise im Bereich von einigen 100 kHz.

Durch dieses elektrische Wechselfeld ergeben sich insbesondere bei DNA sehr große induzierte Dipolmomente, die bereits bei Feldstärken von 10^3 Volt/cm zur vollständigen Ausrichtung im Feld führen. Die Relaxationszeit der Polarisierung liegt bei einer Mikrosekunde. Man kann daher mit hochfrequenten Wechselfeldern bei etwa 10^5 bis 10^6 Hz arbeiten, wobei die Ausrichtung in Millisekunden bis Sekunden erfolgt. Dieser Effekt wird nun ausgenutzt, um die markierte Zielsequenz im Meßvolumen 25 zu konzentrieren.

Die elektrische Molekülfalle 27 verwendet dabei die in dem Meßvolumen 25 angeordnete Elektroden spitze der Neher-Kapillare 29, wobei die Elektroden spitze einen Durchmesser von 1 μ m aufweist. Die ringförmige Gegenelektrode 25 hat dagegen einen Durchmesser von 1 cm.

Die in Fig. 2 der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigte Inkubationslösung 15 füllt den Raum zwischen den beiden Elektroden 29, 28 aus. In diesem Raum entsteht bei Anlegen der Spannung 30, 31 ein inhomogenes Radialfeld, dessen Feldstärke proportional zu $1/r$ ist. Bei einer Elektroden spannung von 10 Volt erreicht man daher an der Spitze bei $r = 1 \mu$ m eine Feldstärke von 10^5 Volt/cm.

Der in der Zielsequenz 10 induzierte Dipol wird in diesem inhomogenen Feld in den Bereich der höchsten Feldstärke, also in den Bereich des Meßvolumens 25 gezogen.

Da das erreichbare Dipolmoment proportional zum Quadrat der Länge ist, wobei im Falle von DNA die Äquivalenzlänge angesetzt wird, lassen sich Feldstärken wählen, auf die nur lange, markierte Nucleinsäurestränge, nicht aber kurzketige Primersequenzen ansprechen. Da ein hochfrequentes Wechselfeld angelegt wird, sprechen auch große starre Dipole wie z.B. Proteinmoleküle auf die elektrische Falle 27 nicht an.

Auf diese Weise ist es also möglich, durch Verwendung des Cocktails die markierten Primersequenzen 12, 13, 14 an der Zielsequenz 10 anzureichern und diese Zielsequenz 10 mit anhybridisierten Primern 12, 13, 14 in das Meßvolumen 25 der Apparatur 20 wandern zu lassen. Die Verwendung des Cocktails erhöht dabei die Intensität des gemessenen Signales, während die Verwendung der elektrischen Molekülfalle 27 die erforderliche Meßzeit deutlich reduziert, da der Diffusions- eine Driftgeschwindigkeit überlagert wird.

Mit dem neuen Verfahren, dem neuen Gemisch 11 sowie der neuen Vorrichtung 20 ist es damit möglich, einzelne Nucleinsäurestränge bekannter und/oder unbekannter Sequenz innerhalb akzeptabler Meßzeiten nachzuweisen.

Wie die nachfolgende Überlegung zeigt, sind die im Meßvolumen 25 auftretenden Wärmeeffekte vernachlässigbar:

Die dissipierte Energie bei einer elektrischen Leitfähigkeit σ und einer elektrischen Feldstärke E beträgt im

homogenen Fall einer Kapillare der Länge l und vom Durchmesser d :

$$Q_{el} = \sigma E^2 l d^2 \pi / 4$$

Das elektrische Wärmeäquivalent beträgt dabei ungefähr 0,2 cal/Ws. Um Q_{el} durch Wärmeableitung aus der Flüssigkeit zu entfernen, bedarf eines stationären Temperaturgradienten dT/dr , wobei angenommen wird, daß das Medium eine Wärmeleitfähigkeit λ aufweist:

$$0,2 \sigma E^2 l d^2 \pi / 4 = \lambda l d \pi \frac{dT}{dr}$$

oder:

$$\frac{dT}{dr} = \frac{\sigma E^2}{\lambda \cdot 20} d$$

In einem typischen Beispiel, bei dem λ für Wasser mit 10^{-3} cal/(cm grad sec) angenommen wird, wobei $\sigma < 10^3$ Siemens und $E = 10$ Volt/cm ist, ergibt sich ein Temperaturgradient von kleiner 0,5 grad/cm, wenn die Kapillare einen Durchmesser von 0,1 cm aufweist. Unter der Annahme, daß der hauptsächliche Wärmestau in Wasser und nicht in der Kapillarenwandung erfolgt, sollte sich damit ein Serum ohne übermäßig starke Verdünnung direkt untersuchen lassen.

Ähnliche Betrachtungen ließen sich auch für die radiale Molekülfalle 27 anstellen. Im Bereich der Elektrodenspitze der Neher-Kapillare 29 beträgt die Feldstärke zwar 10^5 Volt/cm, so daß im Bereich eines μ m ein Temperaturgradient von 10^5 grad/cm entsteht, dies entspricht jedoch einer Überhitzung von 10 Grad im Bereich eines Mikrometers.

Abschließend sei noch erwähnt, daß die Empfindlichkeit des Meßverfahrens weiter gesteigert werden kann, indem zwei oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet und eine Kreuzkorrelation durchgeführt wird, wie es aus der mehrfach erwähnten WO 94/16313 bereits in allgemeiner Form bekannt ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zum direkten Nachweisen weniger, vorzugsweise einzelner Nucleinsäurestränge einer bestimmten Zielsequenz (10) in einer Untersuchungslösung, mit den Schritten:

- a) Bereitstellen einer Testlösung mit einem Gemisch (11) unterschiedlicher, kurzer Primer (12, 13, 14), die jeweils eine zu einem Abschnitt (a, b, c) der Zielsequenz (10) komplementäre, sogenannte Antisense-Sequenz (a', b', c') aufweisen und mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen (16) markiert sind,

- b) Mischen der Testlösung mit der Untersuchungslösung und Inkubieren dieser gemischten Lösung (15) unter Hybridisierung der Primer (12, 13, 14) mit den nachzuweisenden Nucleinsäuresträngen zulassenden Randbedingungen, und dann

- c) Identifizieren der Zielsequenz (10) in der inkubierten Lösung (15) mit einer Apparatur (20) für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein oder mehrere Primer (12, 13, 14) hybridisiert ist bzw. sind, vor dem Hintergrund der nicht hybridisierten Primer (12, 13, 14) zu diskriminieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) zu unterschiedlichen, vorzugsweise nicht überlappenden Abschnitten (a, b, c) der Zielsequenz (10) komplementäre Primersequenzen (12, 13, 14) bereitgestellt werden, wobei unterschiedliche Primersequenzen (12, 13, 14) sich in der Sequenzabfolge der Nucleinsäure-(oder analoger) Bausteine voneinander unterscheiden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) Primer (12, 13, 14) unterschiedlicher Sequenzlänge, also mit unterschiedlicher Zahl der Nucleinsäure-(oder analoger) Bausteine pro Primer (12, 13, 14) bereitgestellt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) Primer (12, 13, 14) mit einer Sequenzlänge zwischen 10 und 50, vorzugsweise 15 und 20 Nucleinsäure-(oder analogen) Bausteinen je Primer (12, 13, 14) bereitgestellt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) Primer (12, 13, 14) mit 10 bis 200, vorzugsweise 20 bis 100 verschiedenen Sequenzen bereitgestellt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer (12, 13, 14) für Schritt a) durch direkte Synthese, bspw. mittels eines Nucleinsäure-Synthetisierers, hergestellt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer (12, 13, 14) für Schritt a) durch Replikation oder Transkription der Zielsequenz in Gegenwart von mit Farbstoffmolekülen markierten Nucleinsäure- (oder analogen) Bausteinen hergestellt werden, wobei die Replikations- oder Transkriptionsprodukte anschließend in Teilsequenzen zerschnitten wer-

- den, die dann als Primer (12, 13, 14) verwendet werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Replikations- oder Transkriptionsprodukte für bestimmte Zeitspannen der Wirkung spezifisch und/oder unspezifisch schneidender Nucleasen ausgesetzt werden, um sie zu Primern (12, 13, 14) abzdauen.
 9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Replikations- oder Transkriptionsprodukte durch Verwendung der Polymerase-Kettenreaktionstechnik (PCR-Technik), eines analogen Verfahrens oder mit Hilfe anderer spezifischer RNA-bzw. DNA-Polymerasen hergestellt werden.
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mittels eines DNA-Synthesizers kurze DNA-Stränge hergestellt werden, die Abschnitte der Zielsequenz aufweisen, daß diese DNA-Stränge bspw. mit der T7-Polymerase transkribiert und die Transkriptionsprodukte als Primer (12, 13, 14) verwendet werden.
 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Primer (12, 13, 14) DNA-, RNA- oder PNA-Sequenzen verwendet werden.
 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) die gemischte Lösung (12) bei einer Temperatur inkubiert wird, die so hoch ist, daß Tertiär- und Sekundärstrukturen der Zielsequenz (10) aufschmelzen, die hinreichend tief ist, so daß die spezifischen Bindungen zwischen Primer (12, 13, 14) und Zielsequenz (10) nicht aufschmelzen, und die hinreichend hoch ist, so daß unspezifische Bindungen zwischen Primer (12, 13, 14) und Zielsequenz (10) aufschmelzen.
 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) die Primer (12, 13, 14) in großem Überschuß gegenüber der Zielsequenz (10) eingesetzt werden.
 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß nach erfolgter Inkubation die ungebundenen Primer (12, 13, 14) von der hybridisierten Zielsequenz (10) abgetrennt werden.
 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Primer (12, 13, 14) positiv geladene PNA-Sequenzen verwendet werden, und die Abtrennung auf elektrophoretischem Wege erfolgt.
 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Identifizieren der Zielsequenz (10) in Schritt c) mittels einer Korrelationsfluoreszenz-Spektroskopie erfolgt, bei der ein sehr kleines Volumenelement (25), vorzugsweise 0,1 - 20 fl der inkubierten Lösung einem Anregungslicht eines Lasers (22) ausgesetzt wird, das die in diesem Meßvolumen (25) befindlichen Primer (12, 13, 14) zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt, das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Meßvolumen (25) mittels eines Photodetektors (26) gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der relativen Diffusionsgeschwindigkeit der beteiligten Moleküle erstellt wird, so daß bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Meßvolumen (25) identifiziert werden.
 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt c) ein elektrisches Feld verwendet wird, um die Driftgeschwindigkeit der mit Primern (12, 13, 14) hybridisierten Zielsequenzen (10) über die Diffusionsgeschwindigkeit hinaus zu erhöhen.
 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt c) eine kapillarelektrophoretische Trennung von ungebundenen Primern (12, 13, 14) und mit Primern (12, 13, 14) hybridisierten Zielsequenzen (10) erfolgt, wobei eine Kapillare (29) mit einer Spitzenöffnung von kleiner 0,01 mm vor das Meßvolumen (25) plaziert und in der Kapillare (29) ein elektrisches Gleichfeld erzeugt wird, das die mit Primern (12, 13, 14) hybridisierten, negativ geladenen Zielsequenzen (10) in Richtung auf das Meßvolumen (25) bewegt.
 19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Quadrupol- oder Radial-Ionenfalle verwendet wird, bei der eine Spitze einer Kapillare (29) von einer Ringelektrode (28) umgeben ist, die ein inhomogenes Feld erzeugt, in dessen maximalem Feldstärkebereich das Meßvolumen (25) liegt.
 20. Verfahren nach Anspruch 17 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt c) ein hochfrequentes inhomogenes elektrisches Wechselfeld verwendet wird, das in den Zielsequenzen (10) ein Dipolmoment induziert, das als solches in dem inhomogenen Feld wandert.
 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Wechselfeld eine Frequenz von mehreren 100 kHz aufweist.
 22. Vorrichtung zur Durchführung des Schrittes c) nach einem der Ansprüche 17 bis 21.

23. Testlösung für Schritt a) nach einem der Ansprüche 1 bis 15.

24. Verfahren zum direkten Nachweisen weniger, vorzugsweise einzelner Nucleinsäurestränge einer bestimmten Zielsequenz (10) in einer Untersuchungslösung, mit den Schritten:

1) Hybridisieren zumindest einiger der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge mit jeweils einem langen Antisense-Strang (17), der mit mehreren Farbstoffmolekülen (16) markiert und zu der gesamten oder nahezu der gesamten Zielsequenz (10) komplementär ist, und

2) Identifizieren der Zielsequenz (10) mit einer Apparatur (20) für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein Antisense-Strang (17) hybridisiert ist, zu diskriminieren.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt 1) die Hybridisierung zwischen nachzuweisendem Nucleinsäurestrang und Antisense-Strang (17) bei Einsatz von farbstoffmarkierten Nucleinsäure-(oder analogen) Bausteinen durch direktes Aufpolymerisieren des nachzuweisenden Nucleinsäurestranges zu einem Doppelstrang aus nachzuweisendem Nucleinsäurestrang und Antisense-Strang (17) erfolgt.

35

40

45

50

55

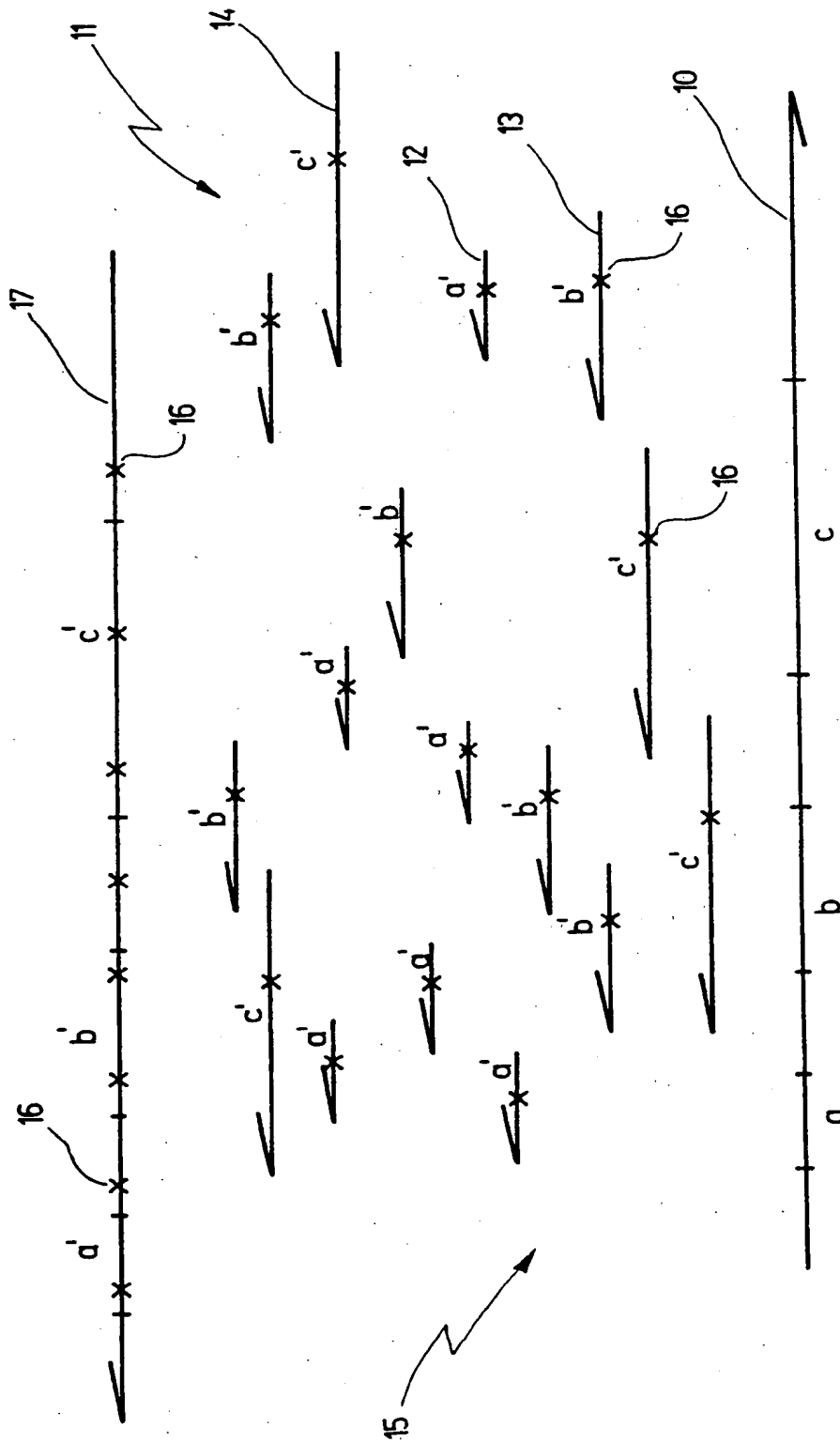


Fig. 1

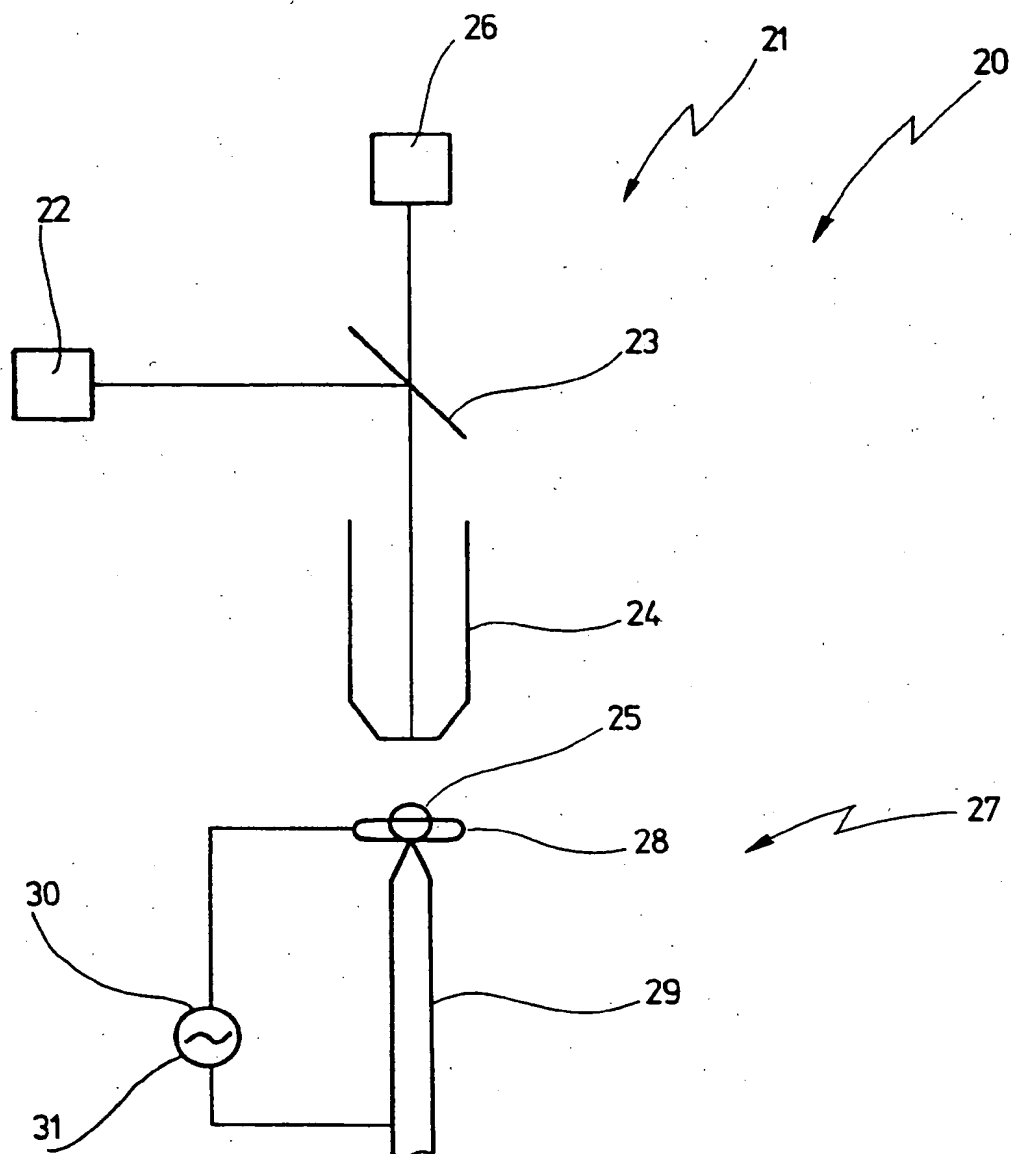


Fig. 2



(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
23.02.2000 Patentblatt 2000/08

(51) Int. Cl.⁷: C12Q 1/68, G01N 27/447

(43) Veröffentlichungstag A2:
11.09.1996 Patentblatt 1996/37

(21) Anmeldenummer: 95119546.0

(22) Anmeldetag: 12.12.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI

- **Rigler, Rudolf, Dr.**
S-182 36 Danderyd (SE)

(30) Priorität: 10.03.1995 DE 19508366

(74) Vertreter:

**(71) Anmelder: Evotec BioSystems AG
22525 Hamburg (DE)**

**Meyers, Hans-Wilhelm, Dr.rer.nat.Dipl.-Chem. et
al
Patentanwälte
von Kreisler-Selting-Werner,
Bahnhofsvorplatz 1
50667 Köln (DE)**

(72) Erfinder:
• **Eigen, Manfred, Prof.Dr.**
37075 Göttingen (DE)

(54) Verfahren zum direkten Nachweisen weniger Nucleinsäurestränge

(57) Ein Verfahren zum direkten Nachweisen weniger, vorzugsweise einzelner Nucleinsäurestränge einer bestimmten Zielsequenz (10) in einer Untersuchungslösung umfaßt die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen einer Testlösung mit einem Gemisch (11) unterschiedlicher, kurzer Primer (12, 13, 14), die jeweils eine zu einem Abschnitt (a, b, c) der Zielsequenz (10) komplementäre, sogenannte Antisense-Sequenz (a', b', c') aufweisen und mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen markiert sind.

b) Mischen der Testlösung mit der Untersuchungslösung und Inkubieren dieser gemischten Lösung (15) unter Hybridisierung der Primer (12, 13, 14) mit den nachzuweisenden Nucleinsäuresträngen zulassenden Randbedingungen, und dann

c) Identifizieren der Zielsequenz (10) in der inkubierten Lösung (15) mit einer Apparatur (20) für optische Analysen, die dazu ausgelegt ist, wenige, vorzugsweise einen der nachzuweisenden Nucleinsäurestränge, an die bzw. den ein oder mehrere Primer (12, 13, 14) hybridisiert ist bzw. sind, vor dem Hintergrund der nicht hybridisierten Primer (12, 13, 14) zu diskriminieren.

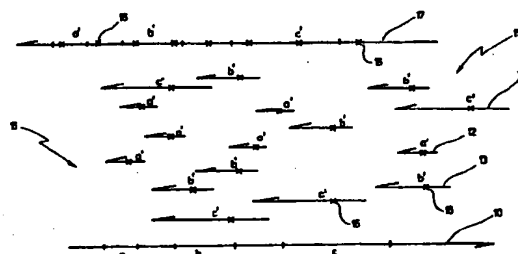


Fig. 1

EP 0 731 173 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 9546

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,X	WO 94 16313 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;RIGLER RUDOLF (DE); EIGEN MANFRED (DE); HE) 21. Juli 1994 (1994-07-21) * das ganze Dokument *	1-25	C12Q1/68 G01N27/447
X	EIGEN M ET AL: "SORTING SINGLE MOLECULES: APPLICATION TO DIAGNOSTICS AND EVOLUTIONARY BIOTECHNOLOGY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 91, Juni 1994 (1994-06), Seite 5740-5747 XP002029412 ISSN: 0027-8424 * das ganze Dokument *	1-25	
X	WO 90 04652 A (DNAX RESEARCH INST OF MOLECULA) 3. Mai 1990 (1990-05-03) * das ganze Dokument *	1-15	
X	WO 93 20236 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) * das ganze Dokument *	1-15	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 462 (C-1101), 24. August 1993 (1993-08-24) & JP 05 111399 A (HITACHI LTD), 7. Mai 1993 (1993-05-07) * Zusammenfassung *	1	C12Q
A	RIGLER R ET AL: "FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY AND APPLICATION TO THE STUDY OF BROWNIAN MOTION OF BIOPOLYMERS" PHYSICA SCRIPTA,SE,STOCKHOLM, Bd. 19, 1979, Seite 486-490 XP000195642 --- -/--		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 17. Dezember 1999	Prüfer Molina Galan, E
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03 82 (P4C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 11 9546

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
P, X	RIGLER R: "FLUORESCENCE CORRELATIONS, SINGLE MOLECULE DETECTION AND LARGE NUMBER SCREENING APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 41, Nr. 2/03, Juli 1995 (1995-07), Seite 177-186 XP000670350 ISSN: 0168-1656 * das ganze Dokument *	1-25	
P, X	WO 95 19449 A (APROGENEX INC) 20. Juli 1995 (1995-07-20) * das ganze Dokument *	1-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 17. Dezember 1999	Prüfer Molina Galan, E
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503/03 B2 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 95 11 9546

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

17-12-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9416313 A	21-07-1994	DE 4301005 A	21-07-1994
		AT 164943 T	15-04-1998
		AU 5884394 A	15-08-1994
		DE 59405644 D	14-05-1998
		EP 0679251 A	02-11-1995
		ES 2116578 T	16-07-1998
		JP 11502608 T	02-03-1999
WO 9004652 A	03-05-1990	US 5002867 A	26-03-1991
		EP 0439550 A	07-08-1991
		JP 4501362 T	12-03-1992
WO 9320236 A	14-10-1993	US 5470705 A	28-11-1995
		AT 173767 T	15-12-1998
		AT 159765 T	15-11-1997
		DE 69314946 D	04-12-1997
		DE 69314946 T	02-04-1998
		DE 69322266 D	07-01-1999
		DE 69322266 T	02-06-1999
		EP 0636186 A	01-02-1995
		EP 0635069 A	25-01-1995
		JP 2775346 B	16-07-1998
		JP 7505529 T	22-06-1995
		JP 2701092 B	21-01-1998
		JP 8504082 T	07-05-1996
		WO 9320239 A	14-10-1993
		US 5514543 A	07-05-1996
		US 5580732 A	03-12-1996
		US 5624800 A	29-04-1997
		US 5703222 A	30-12-1997
		US 5777096 A	07-07-1995
		US 5807682 A	15-09-1998
JP 05111399 A	07-05-1993	KEINE	
WO 9519449 A	20-07-1995	AU 1730395 A	01-08-1995

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82